FACULTÉ DE MÉDECINE SAINT-ANTOINE PARIS

ANNÉE 1975 N°

No 985

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

par

Claude WOLF

né le 21 juin 1950 à Neuilly-sur-Seine

Présentée et soutenue publiquement le :

Etude préliminaire des phospholipases A des membranes d'adipocytes

---

Président : Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI

FACULTE DE MEDECINE SAINT-ANTOINE - PARIS

ANNEE : 1 9 7 5 N°

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Claude WOLF

Maître ès Sciences

Maître en Biologie Humaine

Né le 21 juin 1950 à Neuilly-sur-seine

-:-:-:-:-

Présentée et soutenue publiquement le :

-:-:-:-:-:-

ETUDE PRELIMINAIRE DES PHOSPHOLIPASES A DES MEMBRANES D'ADIPOCYTES

-:-:-:-:-:-

Président : Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA FEMME

A MES PARENTS et MES BEAUX-PARENTS

A MONSIEUR LE DOCTEUR BEREZIAT

Chef de Travaux à la Faculté de Mëdecine

Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A TOUS MES COLLABORATEURS et AMIS du LABORATOIRE,

Madame O. COLARD, Madame D. BARD,
Mademoiselle D. PEPIN,
Mademoiselle M.C. JAN.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544725_0038

A NOTRE MAITRE MONSIEUR LE PROFESSEUR J. POLONOVSKI

qui nous a fait le grand plaisir de présider cette thèse.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre admiration et de notre respect.

A NOS MAITRES,

de la Faculté de Médecine

des Hôpitaux de Paris,

Hommages respectueux et reconnaissants.

P L A N

I. INTRODUCTION 1

II. HISTORIQUE 3

III. MATERIEL et METHODES 9

1. Préparation des membranes cytoplasmiques d'adipocytes..... 9

II. Tests enzymatiques..... 11

III. Mesure de l'activité phospholipasique..... 12

A. - Préparation du substrat..... 12

B. - Mesure de l'activité phospholipasique A des membranes d'adipocytes..... 15

IV. RESULTATS..... 17

1. Mise en évidence d'une activité phospholipasique A1 et A2 au niveau des membranes plasmiques d'adipocytes..... 17

II. Etude de l'activité phospholipasique des membranes d'adipocytes en fonction de la concentration de protéines membranaires..... 19

III. Etude de l'activité phospholipasique des membranes en fonction du temps d'incubation..... 21

IV. Etude de l'activité phospholipasique A1 et A2 en fonction de la concentration en substrat..... 21

V. Etude de l'activité phospholipasique en fonction du pH..... 22

VI. Recherche de facteurs influençant l'activité phospholipasique des membranes isolées d'adipocytes..... 22

1°/ - Essais avec l'adénosine monophosphate 3' - 5' cyclique (AMP cyclique)..... 22

2°/ - Essais d'activation par le lysat plaquettaire . . 23

3°/ - Essais avec le désoxycholate de sodium . . 24

CONCLUSION 25

[illegible] I à IV

ETUDE PRELIMINAIRE DES PHOSPHOLIPASES A DES MEMBRANES D'ADIPOCYTES

INTRODUCTION

La connaissance des enzymes membranaires susceptibles d'agir sur les phospholipides présente un triple intérêt

dans la mesure où les interactions entre protéines et lipides, et la localisation topographique de ces constituants de la membrane sont importantes pour la compréhension aussi bien statique que dynamique de ces édifices membranaires.

Un intérêt enzymologique,

pratique, puisqu'il nécessite l'étude d'une enzyme "in situ", c'est-à dire au sein même de l'organite subcellulaire et donc dans un milieu hétérogène. Dans le cas des phospholipases, cet organite pourrait servir à la fois de substrat, si les phospholipides de la membrane elle-même étaient hydrolysés, et d'activiteur ou d'inhibiteur, si l'activité phospholipasique est modifiée lorsque la "conformation" de la membrane elle-même modifiée par son interaction avec une hormone, comme c'est le cas pour son activité adénylcyclasique. Malheureusement, s'il est vrai que d'étudier une enzyme "in situ" soit une méthode intéressante dans la mesure où elle se rapproche le plus des conditions naturelles d'action de l'enzyme, c'est aussi une méthode plus complexe que d'étudier une enzyme isolée ; en effet, elle se trouve ici dans une phase inhomogène dont on connait mal la structure et donc a fortiori, l'influence sur une activité enzymatique en son sein. Cette méthode est encore rendue plus compliquée dans le cas des phospholipases par le fait que le substrat se présente suivant sa concentration sous deux formes physiques différentes :

- à faible concentration sous forme dispersée,
- à forte concentration sous forme agrégée,

ces cellules résistant ou ne pouvant pas [illegible] aux phospholipides membranaires.

3° [illegible]

[illegible] stade d'une étude sur les [illegible] des leucocytes on peut en retrouver [illegible] propriétés, et par les différences qui apparaîtraient on pourrait en déduire d'intéressantes hypothèses quant à la différenciation de ces deux tissus au niveau enzymatique ;

[illegible] de la membrane de l'adipocyte avec des hormones qui en modifient :

- la structure : ce serait le cas de l'insuline qui rendrait la membrane perméable au glucose (14) ;
- l'activité adénylcyclasique . c'est le cas de l'adrénaline, du glucagon, des hormones antéhypophysaires, T.S.H., M.S.H., S.T.H., A.C.T.H. qui augmentent cette activité (8 et 9) ou au contraire de la prostaglandine F.I. qui l'inhibe (11).

Jusqu'à présent, les travaux les plus importants réalisés sur les phospholipases et les adipocytes sont ceux de RODBELL et de BLECHER. Les travaux réalisés sur des adipocytes isolés (10) ont montré l'action "insulin-like" de la phospholipase C, qui, ajoutée au milieu d'incubation, reproduit non seulement l'action membranaire de l'insuline sur la pénétration du glucose et des acides aminés (11), mais aussi son action anti-lipolytique (12).

M. BLECHER (13 et 14) a retrouvé cette action "insulin-like" avec la phospholipase A2 du venin.

Cet auteur montre bien, de plus, que ce phénomène peut être expliqué par une modification de la structure membranaire, puisqu'il peut être reproduit par addition à basse concentration de lysophosphatidylethanolamine ou de lysophosphatidylcholine.

La structure et le rôle de la membrane cytoplasmique restent encore en partie au moins, une énigme pour la biologie contemporaine.

Certes, depuis le modèle de la double couche phospholipidique proposé en 1925 par GORTER et GRENDEL, bien des progrès ont été réalisés. Une étape essentielle dans ces progrès, est constituée par les travaux de DANIELLI. DANIELLI et HARVEY ont d'abord montré que ce modèle comprenant une couche purement lipidique pouvait être critiqué pour des raisons purement biophysiques. En effet, la tension superficielle développée par la membrane cytoplasmique dans l'eau, est très largement inférieure à celle qu'on peut mesurer avec un tel modèle. Par ailleurs, ce modèle ne tient pas compte de la composition chimique de la membrane qui comprend en plus de 30% (en poids) de phospholipides, 70% de proteines environ.

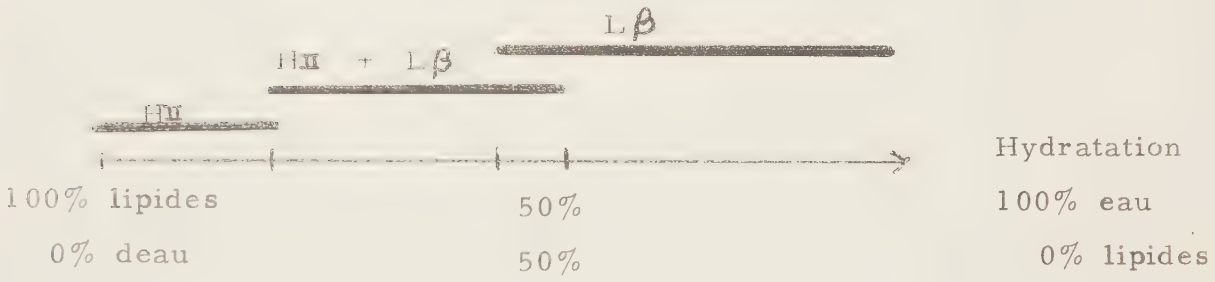
DANIELLI et DAWSON (1 et 2) en 1934, ont donc imaginé un modèle tenant compte de ces deux observations. En effet, à la double couche phospholipidique, serait ajoutée, de part et d'autre, une couche de protéines, dont les propriétés tensio actives, rendraient compte de la faible tension superficielle des membranes. Les premières données de la microscopie électronique, vers 1950, semblent en accord avec cette conception, trilamellaire, de la membrane. En effet, après fixation au permanganate de potassium, on retrouve deux couches sombres encadrant une zone claire centrale le permanganate se fixant sur les parties pôlaires des protéines. La couche externe de protéines ayant 25 Å d'épaisseur, la couche interne 60 Å, l'épaisseur totale de la membrane serait de 120 Å. En fait, ce modèle a fait l'objet de modifications multiples. En effet, d'une part, la fixation des membranes au tétroxyde d'osmium ne montre qu'une couche sombre unique, d'autre part, les diagrammes de phases établis par DUZZATI pour un mélange eau - phospholipide montrent que si une association lamellaire entre les phospholipides peut bien être observée, on peut retrouver pour un degré

d'hydratation légèrement plus faible (20% au lieu de 40%) une organisation micellaire des phospholipides. Le problème posé par les images obtenues après fixation des membranes au tétroxyde d'osmium a été résolu par les [illegible]nces de ROBERTSON et de STOCKENIUS.

[illegible]uteurs ont en effet montré que le tetroxyde d'osmium se fixait sur les parties pôlaires des phospholipides et non pas, comme il avait été suggéré sur les doubles liaisons des acides gras de ces phospholipides

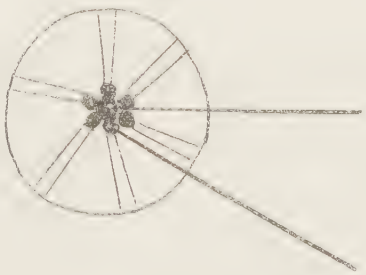
SCHEMAS

1. Diagramme de phases (LUZZATI) obtenu à 20° C.

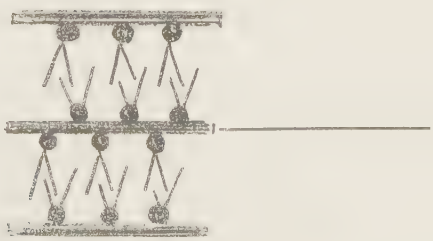


Les différentes phases observées correspondent aux schémas suivants :

HII
(micellaire)



Lβ
(lamellaire
hydraté)



Par ailleurs, on connaît un type d'organisation L_α (lamellaire non hydraté

2. Schéma de l'expérience de ROBERTSON.

(A) et (B) représentent les deux hypothèses émises pour expliquer les images obtenues après fixation au tetroxyde d'osmium.

(A) : si Os O4 se fixe sur les doubles liaisons des acides gras des phospholipides, après addition d'eau, les bandes sombres s'écartent d'une distance d_e variable supérieure à 40 Å.

(B) : si Os O4 se fixe sur les parties pôlaires des phospholipides, après addition d'eau, les bandes sombres restent, deux à deux, distantes de 40 Å : c'est ce type d'image qui est observé en réalité. Le problème soulevé par l'organisation des phospholipides entre eux dans la membrane était encore plus difficile à résoudre. En effet, les diagrammes de phases

obtenus, in vitro, par LUZZATI ne peuvent donner de réponse claire que si l'on connait avec suffisamment de précision le degré d'hydratation au sein même de la membrane. Or, les méthodes physico-chimiques utilisées in vitro, "s'accomodent" mal d'un milieu aussi hétérogène.

Ce problème n'étant donc pas, entièrement résolu, deux grands types de modèle membranaire ont pu être proposés : pour certains auteurs comme SJOSTRAND (3 et 4) ou KAVANAU, ou BENSON (5) ou LUCY (6) la membrane est constituée en partie de sous-unités distinctes, à l'intérieur desquelles l'arrangement des phospholipides est de type micellaire. Entre ces îlots de structure micellaire, il existerait des feuillets lamellaires. Cette conception est basée, d'une part sur les images obtenues en microscopie électronique après cryo-décapage de membranes cytoplasmiques de levure, et d'autre part, sur une analogie de la membrane cytoplasmique avec les membranes internes des mitochondries.

Par ailleurs, de nombreux auteurs pensent que l'organisation des phospholipides dans la membrane, serait essentiellement de type lamellaire, c'est-à-dire constiturait un feuillet bimoléculaire, dont la cohésion serait due aux rapprochements hydrophobes entre les chaînes aliphatiques des acides gras des phospholipides, et qui serait en rapport avec l'eau environnante par l'intermédiaire des parties pôlaires de ces phospholipides.

Cette opinion semble être corroborée par les propriétés physiques des feuillets phospholipidiques bimoléculaires réalisés artificiellement. La mesure de la résistance électrique de ces feuillets donne par exemple des résultats du même ordre de grandeur que celle de la membrane cytoplasmique.

Mais, si la structure physique de la membrane reste encore actuellement un problème difficile à résoudre, les propriétés biologiques de cette organelle rendent périmée l'idée d'une simple enveloppe cellulaire. En effet, les propriétés de perméabilité sélective des membranes, le transport actif de certains ions à travers celles-ci, leurs proprietés contractiles, les possibilités de reconnaissances et d'associations intercellulaires, le phénomène d'inhibition de contact, sont autant de problèmes difficiles posés.

En outre, une partie au moins, des protéines membranaires, n'a pas

seulement un rôle structural, mais aussi, un rôle enzymatique.

Il semble que ce soit le modèle fluide, en mosaïque développé par SINGER et NICOLSON (7) (Science, 1972, 175, p. 720-730) qui rende compte de façon la plus complète, à la fois des propriétés physiques et biologiques de la membrane cytoplasmique. Pour ces auteurs la membrane serait constituée par un double feuillet phospholipidique, fluide et discontinu. Les multiples originalités que présente ce modèle, doivent être décrites ici de façon détaillée, car certaines interprétations, qui sont envisagées dans la suite de ce travail sur les phospholipases membranaires des adipocytes, utilisent ce modèle comme référence.

1°/ - Sur la base de calculs thermodynamiques, les forces secondaires qui assurent la cohésion de l'édifice membranaire, sont essentiellement de deux types

- interactions hydrophobes des chaînes hydrocarbonées des phospholipides entre elles, et interaction de ces chaînes avec les régions apolaires des protéines membranaires ;
- interactions hydrophiles des parties pôlaires des phospholipides et des protéines avec l'eau environnante ;
- Le rôle des autres types d'interactions non covalentes sont de deuxième ordre.

2°/ - Les protéines membranaires se répartissent en deux grands groupes

- 30% de ces protéines seraient de type "périphériques", c'est-à-dire :
  - dissociées de la membrane par des moyens "doux" (non dénaturants) ;
  - ne contenant pas de lipides ;
  - solubles dans des tampons neutres ;
- 70% de ces protéines seraient de type "intégré", c'est-à-dire
  - dissociables de la membrane par des moyens

"bruts" (détergents)
associées à des lipides ;
lipides elles resteraient très insolubles dans des
tampons neutres ,
es protéines "intégrées" seraient disposées au sein mê
me de la membrane, de telle sorte, que si la majori-
té des phospholipides constitue un double feuillet, un
nbre de molécules phospholipidiques, qui
interagissent avec ces protéines "intégrées", n'ont plus
cette organisation lamellaire.

3°/ - Les membranes sont fluides et donc des phénomènes de diffusion latérale dans le plan même de la membrane peuvent se manifester.

MATERIEL et METHODES

I PREPARATION DES MEMBRANES PLASMIQUES D'ADIPOCYTES

(Les membranes sont préparées selon la technique de LAUDAT (15)).

On prélève la graisse épididymaire de 10 à 15 rats mâles de race Wistar, pesant entre 150 et 250 grammes, nourris ad. Libiditum. Cette dissection doit se faire le long des vaisseaux spermatiques et en passant à distance de la tête de l'épididyme. On obtient dans ces conditions, environ 10 grammes de tissu adipeux, qui est lavé deux fois dans du sérum physiologique, séché sur un papier filtre sans graisse et pesé. On répartit alors le prélèvement en lots de 3 grammes chacun.

La digestion par la collagénase (Worthington 100 U/ mg lot 2 KD) est réalisée dans les conditions suivantes

- dans une fiole en plastique ou en verre siliconé (pour que les adipocytes n'adhèrent pas aux parois), on dispose :

  5 mg de collagénase pour 1 gramme de tissu ;

  3 ml de tampon Krebs - Ringer modifié selon COHEN (16) bicarbonaté, à pH 7,4, additionné de 3% (poids/volume) de sérum albumine bovine (fraction V Armour) ;

  et 1 lot de 3 grammes de tissu grossièrement émincé aux ciseaux ;

- la digestion est poursuivie pendant environ trente minutes à 37° C dans un bain-marie avec une agitation forte. De plus, chaque quart d'heure, les fioles sont agitées fortement manuellement.

La durée optimum de cette digestion est celle pour laquelle, il ne reste plus de fragments volumineux non digérés, et pour laquelle, il n'est pas encore apparu à la surface du milieu, de gouttelettes de graisse, signant la lyse de trop nombreux adipocytes.

- Le contenu des fioles est alors filtré sur un tissu de soie japonaise n°12 (DURIEUX), ce qui d'une part, permet de retenir sur le filtre les fragments de tissu conjonctif, et d'autre part, permet d'améliorer la dispersion des adipocytes qui pourraient rester encore assemblés.

Le filtrat recueilli dans un tube en plastique à fond cônique de 40 ml est alors centrifugé à 1000 tours/minute, pendant cinq secondes environ. Il en résulte, une séparation des adipocytes, qui constituent un disque blanc flottant à la surface, des cellules conjonctivo-vasculaires et des hématies qui sedimentent et qui sont éliminées par aspiration à la seringue.

On réalise ainsi deux cycles de lavage - centrifugation dans 20 ml de tampon Krebs Ringer modifié comme précédemment, à la température du laboratoire et un cycle de lavage-centrifugation dans 15 ml d'un milieu contenant du sucrose 0,25 M, du Tris HCl 10mM Ph 7,4 et de l'EDTA ImM, préalablement refroidi vers 10°C (milieu I). C'est dans 10 ml de ce milieu qu'on pratique à l'aide du porte-filtre Swinny, l'homogénéisation de l'isolat adipocytaire par six cycles d'aspiration - éjection, le plus rapidement possible.

L'homogénat est alors centrifugé à 13.000 tours/minute dans un rotor SS - 34, d'une centrifugeuse Sorvall RC 2 B réfrigérée à 4° C pendant dix minutes. On observe alors qu'il se constitue dans le fond du tube un culot qui contient les noyaux, les mitochondries, et les membranes, le surnageant contenant la majeure partie de l'ergastoplasme. A la surface de ce tube, on trouve les lipides libérés des adipocytes, qui s'organisent en deux couches

supérieure constituée par de l'huile et,

. inférieure, solide.

Après avoir éliminé, la graisse solide à la spatule, et le surnageant par aspiration à la seringue, les parois du tube sont nettoyées à l'aide d'un tissu d'ouate de cellulose (Kleenex), et le culot repris par 5 ml de milieu I et remis en suspension par un cycle d'aspiration - éjection dans le dispositif Swinny. Toutes ces opérations doivent être réalisées en chambre froide. On dépose alors la suspension obtenue sur un gradient linéaire de 24 ml d'une solution de sucrose entre 27% et 54% (poids/poids) dans un tampon Tris HCl pH 8,5 10mM, EDTA ImM. On centrifuge alors, pendant soixante minutes; à 24.000 tours/minute, le gradient, dans un rotor à godets mobiles

type SW 25 (Beckman Spinco), la température étant maintenue à 4°C.

Après centrifugation, on peut observer une sédimentation en trois

de superficie liteuse qui contient les membranes

une bande intermédiaire, assez large constituée par les mitochondries

de inférieure très fine, constituée par les noyaux

[illegible] les bandes sont récoltées à l'aide d'un dispositif de perc (Buchler instrument) permettant le recueil des fractions par le fond du tube. Ces fractions sont diluées par addition de cinq volumes de tampon Tris HCl 5 mM pH8,5 et sédimentées à 30.000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots sont alors repris par 2 ml de ce dernier tampon et gardés congelés à moins 20°C.

II. TESTS ENZYMATIQUES

1°/ Dosage de l'activité 5' nucléotidase.

Pour suivre et apprécier la purification des fractions membranaires préparées, on dose l'activité 5' nucléotidase selon la technique de DIXON et PURDON M. (17) (J. Clin. Pathol., 1954, 7, p. 341). Dans ces conditions, l'activité enzymatique étant très faible, il est nécessaire d'utiliser 150 γ de protéines membranaires et de doser l'acide phosphorique libéré à chaud, c'est-à-dire selon la modification de DELSAL J.L. et MANHOURY M. (18) (Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, p. 1041) du procédé de FISCKE Ch. et SUBBAROW Y. (J.B.C., 1925, 66, p. 375) (19).

2°/ Pour apprécier l'importance de la contamination microsomiale, on dose l'activité glucose 6 phosphatase selon la technique de DUTTERA SM. BYRNE W.L., et GANOZA (20) (Bioch. Journal, 1955, 59, p. 433). On peut s'étonner d'un tel choix, dans le cas des adipocytes, car ces cellules sont beaucoup plus souvent considérées comme utilisatrices de

glucose, que comme des cellules susceptibles de libérer du glucose. En réalité, on doit reconnaître d'emblée que ce dosage n'a posé aucun problème particulier par rapport aux dosages réalisés avec les hépatocytes. Ce dosage a été par la suite complèté par le dosage de l'activite NADH - cytochrome C réductase (23).

3°/ La détermination de la concentration en protéine dans les différentes fractions est réalisée par la méthode de LOWRY (21), le réactif de FOLLIN CIOCALTEU ayant toujours été dilué de moitié dans l'eau.

III. MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE.

A. Préparation du substrat

Le substrat utilisé au cours de cette étude, est la phosphatidyléthanolamine dont la fonction alcoolique secondaire du glycérol (position 2) est estérifiée par l'acide linoléïque marqué au ^{14}C sur le carbone carboxylique

a) La phosphatidylethanolamine (PE) est extraite, en même temps que les autres phospholipides d'une culture congelée d'E. Coli de la façon suivante

- dans 100 ml de méthanol, on homogénéïse à l'aide d'un mixer Ultraturax, 10 g. d'E. Coli ;
- après 24 heures à température ambiante, on ajoute 50 ml de chloroforme et on assure le mélange de l'homogénat bactérien avec cette phase par un nouveau passage à l'Ultraturax ;
- on élimine par centrifugation, les fragments bactériens et on évapore à sec le surnageant ;
- l'extrait lipidique sec est repris par 30 ml de mélange chloroforme (méthanol (2/1 ; vol/vol) à partir duquel on extrait les phospholipides par la technique de FOLCH J., LEES M., SLOANE, STANLEY [illegible] (J.B.C., 1957, 226, [illegible] 497) 22 ;
- le fractionnement des phospholipides est réalisé par une

- chromatographie d'adsorption sur colonne d'acide silicique. Pour cela, on utilise une colonne de 2 centimètres de diamètre, remplie sur 14 centimètres de hauteur par de l'acide silicique préalablement lavé par du méthanol. Une telle colonne est capable de supporter une charge de 8 mg de phosphore phospholipidique et par conséquent l'extrait phospholipidique provenant des 10 grammes de bactéries congelées peut être chromatographié en totalité d'une seule fois ;
l'élution de la colonne se fait par étapes, par 100 ml de chacun des mélanges chloroforme/méthanol suivant : 19/1, 7/1, puis 4/1 (vol/vol) et des aliquotes de ces trois fractions sont ensuite chromatographiées sur couche mince de gel de silice G par le mélange méthanol/chloroforme/eau (65/25/4 : v/v). La révélation par les vapeurs d'iode permet de contrôler que la phosphatidyléthanolamine est localisée dans la fraction 7 / 1
A partir de 10 grammes d'E. Coli congelés, on obtient environ 120 mg de PE.

c) Cette PE froide est alors hydrolysée par la phospholipase A2 du venin de Crotalus Adamanteus, pendant quinze heures, à l'interface d'un milieu biphasique comprenant :

- d'une part, 30 mg de PE dans 3 ml d'éther éthylique ;.
- et d'autre part, 3 mg d'extrait sec du venin dissous dans 3 ml de tampon 0,2 M Tris HCl pH 7,5.

d) Le substrat marqué spécifiquement est préparé par réacylation des lyso-dérivés formés, par des microsomes de foie de rat, en présence d'acide linoléïque 1 ^{14}C (58 mCi/mmole).

Il existe alors deux possibilités :

- ou bien on sépare les lyso-dérivés, des acides gras libérés de la PE froide initiale, et la réacylation se fait en présence d'acide linoléïque radio-actif dilué dans de l'acide linoléïque froid ;

- ou bien la réacylation se fait en présence des acides gras libérés par la phospholipase A2 du venin, dans lesquels on dilue l'acide linoléïque radio-actif.

Dans le premier cas, il semble a priori possible d'obtenir une espèce moléculaire unique, en position β, occupée uniquement par de l'acide linoléïque. En réalité, en même temps, qu'on extrait ces 2 - linoléyl ($1\,^{14}C$) - PE du mélange de réacylation, on extrait également une partie de la PE des microsomes et donc on ne pourra obtenir d'espèce moléculaire unique.

La réacylation s'effectue dans les conditions suivantes :

- à 25 μ moles de lyso-dérivés ultrasonnés avec 125 μ Ci d'acide linoléïque dans du tampon $KH_2\ PO_4$ 0,2 M pH 7,4 sont ajoutés, 100 μ moles d'ATP, Mg^{++}, 2 μ moles de Coenzyme A, et I mg d'une suspension microsomiale préparée extemporanément ;
- le mélange final est ultrasonné brièvement avant d'être incubé une heure à 37 °C ;
- Les lipides sont alors extraits par du mélange chloroforme méthanol 1/2 (v/v) et la PE formée est purifiée par chromatographie sur plaque de gel de silice et éluée après repérage du spot en autoradiographie.

Dans ces conditions, on obtient une PE - 2 ($1\,^{14}C$) linoléyl ayant une activité spécifique de 2,5 . 10^5 dpm/δ de phosphore.

L'hydrolyse de cette PE par la phospholipase A2 du venin et le comptage des acides gras libérés montre que 90% de l'acide linoléïque radio-actif est incorporé en position 2.

L'utilisation de ce substrat pour mesurer l'activité phospholipasique des membranes adipocytaires suggère d'emblée deux observations :

- d'une part, pour les raisons exposées plus haut, il ne s'agit pas d'une espèce moléculaire unique. Donc, si l'activité phospholipasique est influencée par la nature de l'acide gras, ce substrat ne permet que de mesurer une activité

phospholipasique moyenne ;

d'autre part, les activités phospholipasiques étant déterminées par mesure de la distribution de la radio-activité entre les acides gras, la PE, et les lyso-dérivés, le substrat n'étant pas rigoureusement spécifique, on risque d'évaluer par excès l'activité phospholipasique A2 et par défaut l'activité A1, ou réciproquement, suivant l'activité A1 est prépondérante, ou au contraire l'activité A2 ;

enfin, il s'agit d'un substrat dont la solubilité en milieu aqueux est très faible. A basse concentration, il se trouve sous forme dispersée (mono- ou bimoléculaire). A haute concentration, sous forme agrégée, au-delà de la concentration micellaire critique, bien qu'il subsiste toujours une fraction sous forme dispersée. Donc là encore, ce substrat ne permet que de mesurer une activité moyenne sur un mélange de formes physiques différentes.

B.- Mesure de l'activité phospholipasique A des membranes d'adipocytes

- Le substrat marqué est ultrasonné quatre fois quinze secondes dans du tampon Tris HCl O,IM pH 8,5, le tube devant être conservé dans la glace.

Les quantités de substrat et de tampon sont calculées pour que le volume à mettre dans l'essai reste inférieur à 50 µl.

L'efficacité de la remise en suspension par l'ultrasonation est appréciée par un comptage en scintillation liquide d'une aliquote.

- Le tampon d'incubation constitué par du Tris HCl O,1 M pH 8,5, est additionné de NaCl 0,2 M et de $CaCl_2$ 4 mM.

- On utilise des quantités variables de membranes en général de l'ordre de 100 µg de protéines membranaires. Cette quantité est ajustée plus précisément sur la valeur de la l'activité 5' nucléotidase.

- Les incubations sont faites dans un bain-marie à 37° C, avec agitation et arrêtées par dix volumes du mélange chloroforme - méthanol (1/2 : v/v), ce qui permet à la fois, d'obtenir un mélange tertiaire

homogène, et d'extraire les lipides.

- L'extrait est alors évaporé à sec et repris par 0,5 ml de mélange chloroforme / méthanol (1/1 ; v/v) et 0,2 ml de cette reprise est déposé sur couche mince de gel de silice et chromatographié dans le système chloroforme - méthanol - eau (65/25/4).

Les produits peuvent être alors visualisés-soit par autoradiographie ce qui est une technique longue (en moyenne deux jours sont nécessaires à l'impression du film), mais précise et qui permet de garder un document.

- soit par addition d'une quantité de standard interne constitué par un mélange acide gras, PE, Lyso-PE, qui permettra la visualisation de ces trois spots par fixation d'iode. Cette deuxième technique, a l'avantage d'être brève, et de ne visualiser que les trois spots nécessaires à la mesure de l'activité phospholipasique.

Il est en effet important de préciser, que l'autoradiographie lorsqu'elle est pratiquée montre que pour des concentrations moyennes ou fortes de substrat, on retrouve une partie de la radio-activité en dehors des trois spots attendus. Il s'agit pour une part, d'impuretés déjà présentes dans le substrat, ou de produits de dégradation se formant spontanément, puisqu'on peut les retrouver dans les incubations témoins de substrat sans membranes.

Il s'agit peut-être par ailleurs, d'une redistribution de la radio-activité des acides gras libérés par des enzymes membranaires. Mais le comptage de ces spots non identifiés, lorsqu'il a été réalisé, n'a pas montré de différence importante dans l'appréciation de l'activité phospholipasique.

Le comptage de la radio-activité des spots d'acide gras , de PE, de lyso-PE se fait, après grattage, en scintillation liquide. On utilise pour corriger le quenschng, soit la méthode du rapport des canaux, soit la standardisation externe.

RESULTATS

I. MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE A1 et A2 AU NIVEAU DES MEMBRANES PLASMIQUES D'ADIPOCYTES

Cette étude, faisant suite à une étude sur les phospholipases membranaires des hépatocytes (COLARD O., Thèse de Sciences 1975) (24), des conditions d'incubation identiques ont été choisies a priori.

Dans ces conditions d'incubation

- tampon Tris HCl 0,1M pH 8,5, additionné de NaCl 0,2 M, $CaCl_2$ 4 mM,
- et pour une concentration de 32 μM de phosphatidyléthanolamine 2 linoléyl ($1^{14}C$),
- et 100 μg de protéines membranaires,

on obtient après déduction du témoin d'hydrolyse spontanée du substrat (d'environ 1% en position 1 ou 2) en trente minutes à 37° C :

- une activité phospholipasique A2 correspondant à 3% de substrat hydrolysé,
- et une activité A1 à 2% de substrat hydrolysé.

Ces chiffres correspondent à une activité spécifique extrêmement faible, soit

- 0,32 nm/min./mg de protéines membranaires pour l'activité A2,

et 0,2 nm/min./mg de protéines membranaires pour l'activité A1.

Ces activités sont donc environ dix fois plus faibles que celles trouvées dans le cas des membranes d'hépatocytes.

Il était donc nécessaire, d'une part de répéter les expériences (les chiffres indiqués plus haut, sont en fait les moyennes des résultats de six essais) et d'autre part, de montrer qu'il s'agissait d'une activité

membranaire.

Le deuxième point est assez difficile à démontrer : en effet, il faut admettre que l'activité phospholipasique contaminante, est bien celle qui est due aux organelles, dont on pense a priori, qu'ils contaminent la fraction membranaire. On admet de plus ici que l'activité spécifique phospholipasique mesurée pour des préparations particulières de ces organelles, reste la même dans la préparation membranaire.

On a considéré ici, à la suite des travaux de MAC KEEL et JARETT (25), que la fraction membranaire est essentiellement contaminée par de l'ergastoplasme.

La détermination de l'activité NADH-cytochrome C - réductase dans la fraction membranaire et dans la fraction microsomiale, telle qu'elle est obtenue après la première centrifugation différentielle de l'homogénat d'adipocyte (confer Chapitre Matériel et Méthodes), montre une contamination microsomiale de la fraction membranaire de l'ordre de 25%. Or, l'activité spécifique phospholipasique de la fraction microsomiale et de la fraction membranaire paraissent du même ordre de grandeur.

Activité spécifique nm/mg/min.	Membranes	Microsomes
Phospholipase A2	0,32	0,30
Phospholipase A 1	0,2	0,15

On peut donc penser que le quart de l'activité phospholipasique de la fraction membranaire est attribuable, en fait, aux microsomes, mais les membranes ont bien une activité phospholipasique.

A cette action phospholipasique très faible des membranes, il correspond aussi une activité 5 ' nucléotidasique très faible.

Mac KEEL et JARETT n'ont pas retrouvé d activité 5 'nucléotidasique dans ces membranes, ni d'ailleurs dans aucune autre fraction subcellulaire d'adipocytes (25).

AVRUCH et WALLACH (26) ont pu retrouver cette activité, mais dans des conditions d'incubation légèrement différentes.

Par une technique légèrement différente de celle utilisée dans le cas des membranes d'hépatocytes, on retrouve une activité faible, mais suffisante pour évaluer le degré de purification de la fraction membranaire.

Activité spécifique 5' nucléotidasique
(en mn / mg / min)

Homogénat.....	21,5
Membranes.....	93,2

La purification est donc de 4,4 fois, donc plus faible que celle signalée par AVRUCH et WALLACH (jusqu'à 9 fois) et du même ordre de grandeur que celle signalée par Mc KEEL et JARETT (4,3 fois).

II. ETUDE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES MEMBRANES D'ADIPOCYTES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE PROTEINES MEMBRANAIRES

Une série d'incubations a été réalisée, à pH 8,5, dans 1 ml de tampon Tris HCl 0,1M NaCl 0,2 M. $CaCl_2$ 4 mM, en présence de 32 nmoles de PE - 2 (1 ^{14} C Linoleyl) (concentration 32 M), pendant trente minutes à 37 C.

Le tableau I résume les résultats obtenus

Quantité de protéines en mg	Fraction de PE hydrolysée en % en position 1	en position 2
10	1	1
21		
54,5	2	1,3
90	3	1,7
107	3,4	2
135	3,8	2,5
214	4,5	3,3
435	5,7	N.D.

Les activités phospholipasiques A1 et A2, restent donc linéaires jusqu'à une concentration d'au moins 1,5 g/ml de protéines. Au-delà, on observe un infléchissement de la courbe surtout prononcé pour l'activité A2.

D'autre part, le fait que ces courbes ne passent pas par le zéro peut s'expliquer par l'erreur relative importante de la mesure quand la fraction hydrolysée est très faible.

III. ETUDE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES MEMBRANES EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION

Une série d'incubations a été réalisée à 37° C dans du tampon Tris HCl 0,1M pH 8,5, NaCl 0,2 M, $CaCl_2$ 12 mM avec une concentration de 52 µM de substrat spécifiquement marqué en présence de 100 µg/ml de protéines membranaires, et pour des temps d'incubation variables. La figure 2 en résume les résultats. On observe que l'activité A2 reste linéaire pendant 90 minutes, et l'activité A1 pendant au moins 60 minutes. Ce phénomène s'explique bien, si l'on considère qu'après 60 minutes d'incubation on a seulement 9% de substrat hydrolysé, soit en position 1, soit en position 2.

Il aurait donc été étonnant dans ces conditions que la concentration en substrat devienne limitante.

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE A1 et A2 EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

Une série d'incubations a été réalisée à 37° C pendant 30 minutes dans 1 ml de tampon Tris HCl, 1 M pH 8,5, NaCl 0,2 M, $CaCl_2$ 4 mM en présence de 100 µg de protéines membranaires et d'une concentration variable de substrat. La figure 3 résume les résultats de trois expériences réunies. Ces courbes, aussi bien pour l'acitivité A1, que A2, ne répondent pas au schéma classique d'une cinétique michaelienne.

Il s'agit en effet de la juxtaposition de deux branches d'hyperboles, l'une à basse concentration (inférieure à 48 µM), l'autre pour des concentrations supérieures.

Le point d'inflexion pourrait s'expliquer par un changement d'état physique du substrat qui passerait d'une forme dispersée, à une forme agrégée sur laquelle l'enzyme serait plus active (27). La concentration pour laquelle se produit ce changement d'état (concentration micellaire critique) est donc dans les conditions de température, de pH et de salinité utilisées ici de l'ordre de 48 µm.

V. ETUDE DE L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE EN FONCTION DU pH

Une série d'incubations a été réalisée à 37° C pendant 45 minutes, en présence de 100 µg de protéines membranaires et de 32 nmoles de substrat spécifiquement marqué dans 1 ml de tampon Tris - Maleate 0,1M entre pH 5 et pH 8, ou dans 1 ml de tampon TrisHCl entre pH 7 et pH 9.

La figure 4 en résume les résultats. Il apparait donc pour chaque type d'activité phospholipasique 2 - pH optimums.

On peut donc penser, soit qu'il existerait 4 types de phospholipases, soit que la préparation membranaire est contaminée, en particulier par des lysosomes ce qui rendrait compte du pH optimum d'action acide observé. On remarque par ailleurs, les variations assez fortes d'activité lorsque le pH varie, ce qui fait donc présumer d'une exposition assez large du site d'action enzymatique des phospholipases au milieu extérieur et donc à ses variations.

VI. RECHERCHE DE FACTEURS INFLUENCANT L'ACTIVITE PHOSPHOLIPASIQUE DES MEMBRANES ISOLEES D'ADIPOCYTES

1°/ Essais avec l'adénosine monophosphate 3' - 5' cyclique (AMP cyclique)

CHIAPPE de CINGOLANI (28) a montré en 1972 que les activités phospholipasiques A1 et A2 d'un homogénat de graisse épididymaire étaient stimulées par la présence d'AMP cyclique. Pour chercher à retrouver cet effet activateur au niveau des fractions membranaires et microsomiales préparées ici,

- plusieurs séries d'incubation ont été réalisées dans des variables ;
- de concentration de substrat entre 4 et 96 µM,
- de concentration d'AMP cyclique entre 0,1 et 10 mM,

en présence ou non, du surnageant 105.000 g de la fraction

microsomiale, et d'ATP (10mM).

Jusqu'à présent, aucune des expériences réalisées n'a montré de variations significatives ou systématiques des activités phospholipasiques alors que dans les mêmes conditions, on a retrouvé un facteur d'activation de la fraction microsomiale de 1,6.

3°/ Essais d'activation par le lysat plaquettaire

J. ETIENNE et Coll. (29) ont montré qu'un lysat de plaquettes de rat, provoquait une activation de la phospholipase A2 au niveau du sérum, et d'un homogénat de paroi artérielle.

O. COLARD (24) a montré que cette activation peut être retrouvée pour la phospholipase A2 des membranes d'hépatocytes, mais non pas, pour la phospholipase A1.

On a donc cherché ici à retrouver cet effet au niveau des membranes isolées d'adipocytes. Le tableau II résume les résultats obtenus pour une série d'incubations réalisées à 37 ° C pendant 45 minutes, dans 1 mL de tampon Tris HCl O,1M pH 8,5, NaCl 0,2 M, CaCl2 4mM, en présence de 32 mM de substrat spécifiquement marqué et de 100 µg de protéines membranaires.

Tableau II

	% de substrat hydrolysé	
	en position 2	en position 1
Membranes seules	4,5	3
Lysat seul dilué au demi (10 µl)	1	0,4
Membranes + lysat (10 µl)	5	3

On ne peut donc pas observer comme c'est le cas pour la phospholipase A2 des membranes d'hépatocyte d'activation par ce facteur plaquettaire.

3°/ Essai avec le désoxycholate de sodium

Cette expérience semble intéressante à deux pointsde vue :

- d'une part, le désoxycholate modifie l'émulsion phospholipasique, or, ici, l'état physique du substrat semble avoir une grande influence sur l'activité enzymatique ;
- d'autre part, le désoxycholate étant un inhibiteur des lysophospholipases ( ), il devient possible en sa présence de mesurer les activités phospholipasiques débarrassées de cette éventuelle activité contaminante.

Une série d'incubations a été réalisée à 37° C pendant 45 minutes, dans 1 ml de tampon Tris HCl 0,1M pH 8,5, NaCl 0,2 M, $CaCl_2$ 4mM, en présence de 80 µg de protéines membranaires et 28 µM de substrat spécifiquement marqué. La Figure 5 montre que lorsque la concentration de désoxycholate de sodium augmente de 0,5 à 4 mg par ml, les activités phospholipasiques décroient régulièrement.

00° - °00

C O N C L U S I O N

Le travail met en évidence l'existence d'activités phospholipasiques A1 et A2 au niveau des membranes cytoplasmiques d'adipocytes.

Trois problèmes se trouvent donc posés d'emblée

1°/ - La technique de mesure de cette activité enzymatique est-elle bien adaptée au cas présent et quelle est sa précision ?

2°/ - S'agit-il bien d'une activité adipocytaire ?

3°/ - S'agit-il bien d'une activité membranaire ?

1°/ - Le problème des conditions de mesure de l'activité phospholipasique se pose ici de façon particulièrement difficile. En effet, cette activité étant très faible (de l'ordre de la nanomole de substrat transformé par milligramme de protéines membranaires par minute). Il semble indispensable de répéter plusieurs fois chaque expérience pour que les variations d'activité enzymatique enregistrées soient au moins systématiques, si elles ne sont pas toujours d'emblée significatives compte tenu de l'imprécision de mesure.

Nous pensons que cette précision peut être augmentée de trois façons

a) En choisissant à la suite d'une étude plus détaillée, des conditions d'incubation où l'activité enzymatique sera maximum.

b) En identifiant tous les spots radio-actifs autres que le substrat et ses produits d'hydrolyse, qui sont révélés par autoradiographie après chromatographie sur plaque.

On a en effet pu observer que 80% environ de la radio-activité déposée sur la plaque se retrouvait au niveau de la phosphatidyléthanolamine, de son lysodérivé, et des acides gras : donc 20% de la radio-activité se

retrouve dans d'autres produits qui pourraient résulter d'une transacylation. Dans le cas où cette transacylation serait postérieure à l'hydrolyse du substrat, la mesure de l'activité phospholipasique A2 en particulier se trouverait appréciée par défaut.

c) Enfin, la précision de la mesure de l'activité phospholipasique, surtout pour ses plus faibles valeurs pourrait se trouver améliorée par une détermination plus précise de l'efficience de comptage. Ceci suppose donc de remplacer la technique simplifiée de comptage direct de la poudre de silice après grattage, soit par émulsification de cette poudre par le carbosil, soit par la technique d'élution préalable de la poudre par la méthode de SNYDER (30) modifiée par ARVIDSON (31).

2°/ - S'agit-il bien d'une activité adipocytaire ?

Les observations histologiques réalisées sur le tissu adipeux ont montré que ce tissu contenait une forte proportion de cellules non adipeuses, en particulier, des cellules conjonctives, vasculaires et sanguines. La technique de centrifugations - lavages répétées après isolement cellulaire, imaginée par RODBELL (10) semble particulièrement adaptée pour résoudre ce problème. Les observations microscopiques ont en effet montré qu'on ne retrouve qu'au niveau du culot et du liquide de lavage, les cellules vasculaires qui restent d'ailleurs associées comme dans la paroi des vaisseaux et constituent donc une sorte de "squelette" vasculaire débarrassé du tissu environnant. Par ailleurs, certains auteurs considèrent qu'il s'opère au cours de l'isolement cellulaire une sélection des adipocytes ayant la plus faible taille, soit que les cellules les plus volumineuses qui sont les plus fragiles soient lysées, soit qu'au cours de la filtration sur soie japonaise, elles soient retenues.

3°/ - S'agit-il bien d'une activité membranaire ?

Il semble difficile de résoudre de façon complète ce problème. Dans ce travail, on a pu seulement montrer qu'il ne s'agissait vraisemblablement

- ni d'une activité microsomiale,
- ni d'une activité lysosomiale.

De plus, même pour ces fractions contaminantes, le choix des enzymes marqueurs peut être discuté. En effet, la contamination microsomiale est appréciée par l'activité N.A.D.H. cytochrome C réductase, dont EMMELOT (32) a montré qu'elle pouvait appartenir en propre aux membranes cytoplasmiques

D'autre part, G.L. SOTTOCASA (33) a retrouvé cette activité dans la membrane mitochondriale externe. Le dosage de l'activité glucose - 6 phosphatase, est encore plus difficile à interpréter dans la mesure où on peut considérer qu'il traduit l'activité des phosphatases non spécifiques des lysosomes et / ou une activité microsomiale.

I. Mode de fonctionnement des phospholipases membranaires

La vitesse de la réaction enzymatique aussi bien pour la phospholipase A1 que A2, semble nettement influencée par les variations du pH du milieu extérieur et par le changement d'état physique du substrat.

En se référant au modèle membranaire en mosaïque de SINGER (7), ces deux observations suggèrent :

- ou bien qu'il s'agit de protéines périphériques,
- ou qu'il s'agit de protéines intégrées,

mais dont le site actif serait disposé à la surface de la membrane et donc largement exposé aux variations du milieu extérieur.

Pour choisir entre ces deux possibilités, il faudrait mesurer l'activité enzymatique sur les phospholipides endogènes et essayer de détacher ces enzymes du restant de la structure membranaire.

II. Localisations de l'activité phospholipasique membranaire et rôle physiologique éventuel

Les observations de RODBELL (11 et 12) et BLECHER (13 et 14)

montrent que l'action de l'insuline, non seulement au niveau membranaire, mais aussi au niveau de la lipogénèse, peut être reproduite par une hydrolyse modérée des phospholipides membranaires. La stimulation de la pénétration intra-cellulaire du glucose, induite par les phospholipases A ou C gardant son caractère de transport spécifique, l'hydrolyse des phospholipides intervient ici, en modifiant la conformation et donc l'activité de la protéine de transport du glucose. Le modèle membranaire décrit par SINGER, rend là encore bien compte de l'importance structurale des interactions entre les phospholipides membranaires et les protéines intégrées.

Il est donc particulièrement intéressant ici, de formuler l'hypothèse selon laquelle l'insuline agirait au niveau de la membrane de l'adipocyte en stimulant son activité phospholipasique intrinsèque. Ce phénomène, qui ne fait intervenir à aucun moment l'A. M. P. cyclique, mettrait donc en rapport l'activité physiologique de l'insuline au niveau membranaire, avec une modification de la structure membranaire secondaire à une hydrolyse de ses phospholipides constituants.

00 - 00

BIBLIOGRAPHIE

1. BROWN F. et DANIELLI J.F.
Cytology and Cell Physiology.
Acad. Press. Inc., New-York, 1964, p. 239, Chez G.H. Bourne Editeur.

2. ROBERTSON J.D.
Ann. N.Y. Acad. Scie., 1966, 137, p. 421.

3. SJÖSTRAND F.S.
Cytology and Cell Physiology.
Acad. Press. Inc., New-Jork, 1964 p. 311, Chez G.H. Bourne, Editeur.

4. SJÖSTRAND F.S.
in Structural and Functional aspects of lipoproteins in living systems.
N.Y. Acad. Press., 1969, p. 73-128.

5. BENSON A.A.
J. Amer. Oil. Chem. Soc., 1966, 43, p. 265.

6. LUCY J.A.
J. Theoret Biol., 1964, 7, p. 360.

7. SINGER S.J., NICHOLSON G.L.
Science, 1972, vol. 175, p. 720-730.

8. SUTHERLAND E.W., RALL W., and MENON T.
J.B.C., 1962, 237, p. 1220.

9. RALL T.W., and SUTHERLAND E.W.
J.B.C., 1962, 237, p. 1228.

10. RODBELL M.
J.B.C., 1964, 239, p. 375.

11. RODBELL M.
J.B.C., 1966, 241, p. 130.

12. RODBELL M. and JONES A.
J.B.C., 1966, 241, p. 140.

13. BLECHER M.
B.B.A., 1967, 137, p. 557.

14. BLECHER M.
Biochem. Biophys. Res. Com., 1966, 23, p. 68.

15. LAUDAT et Coll.
B.B.A., 1972, 255, p. 1005.

16. COHEN P.P.
in Manometric Technics.
3ème Edn., 1957, p. 147, Chez Burgess Publisching Co.

17. DIXON and PURDON M.
J. Clin. Pathol., 1954, 7, p. 341.

18. DELSAL J.L. et MANHOURY M.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, p. 1041.

19. FISCKE Ch. and SUBBAROW Y.
J.B.C., 1925, 66, p 375.

20. DUTTERA S.M., BYRNE W.L. and GANOZA.
Bioch. Journal, 1955, 59, p. 433.

21. LOWRY, ROSEBROUGH J.H., FARR A.L. and RANDELL R.J.
J.B.C., 1951, 191, p. 265.

22. FOLCH J., LEES M. and SLOANE - STANLEY G.H.
J.B.C., 1957, 226, p. 497.

23. MACKLER B.
Methods in Enzymology.
Chez R. Estabrook, M. Pulman Edn., 1967, vol, X, p. 551.

24. COLARD O.
Thèse de Sciences, 1975.

26. AVRUCH et WALLACH.
B.B.A., 1971, 233, p. 334.

25. Mc. KEEL and JARETT.
J.C.B., 1970, p. 417.

27. GATT S., YECHEZKEL B.
Ann. Rev. Bioch., 1072, 42, p. 129.

28. CHIAPPE de CINGOLANI, VAN DEN BOSH and VAN DEENEN.
B.B.A., 1972, 260, p. 387.

29. DUCHESNE M.J., ETIENNE J., GRÜBER A. et POLONOVSKI J.
Biochimie, 1972, 54, p. 257.

30. SNYDER
Ann. Biochem., 1964, 9, p. 183.

31. ARVIDSON.
Eur. J. Biochem., 1968, 4, p. 478.

32. EMMELOT P. et BENEDETTI E.L.
in The membranes
Acad. Press. Inc. N.Y., 1968.

33. SOTTOCASA G.L. KNYLENSTIERNA B. ERNSTER L. and BERGSTRAND A.
J.B.C., 1967, 32, p. 415.

00. - .00

VU, LE DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur J. DEBRAY

VU, LE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI

VU et PERMIS D'IMPRIMER

Le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET

0

0 0